

Fenotipos en la EPOC: presente y futuro

P. SOBRADILLO¹, A. AGUSTÍ^{1,2,3,4}

¹Ciber en Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Mallorca

²Fundación Caubet Cibera, Mallorca

³Servicio de Neumología, Instituto del Tórax, Hospital Clinic, Barcelona

⁴Institut d'investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona

Correspondencia: Patricia Sobradillo
CIBERES. Calle Córcega 180, bajos izquierda.
08036 Barcelona.

e-mail: psobradillo@ciberes.org

RESUMEN

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) es una enfermedad compleja y multi-componente. Su diagnóstico y valoración actuales están estrechamente relacionados con la presencia de limitación escasamente reversible al flujo aéreo. Sin embargo, el volumen espirado en el primer segundo de una maniobra de espirometría forzada (FEV₁) no es capaz de abarcar la heterogeneidad de la enfermedad, por lo que es necesario identificar subgrupos de pacientes (fenotipos) con pronósticos y tratamientos más homogéneos. Para revisar y discutir este tema, este artículo se ha estructurado en cuatro apartados: 1) Definición de fenotipo, 2) Fenotipos validados hasta ahora, 3) Fenotipos potenciales, 4) Estudios en marcha y técnicas estadísticas disponibles para la identificación y validación de nuevos fenotipos.

PALABRAS CLAVE: epidemiología, heterogeneidad, mortalidad, pronóstico, tratamiento.

Introducción

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) se define por la presencia de limitación al flujo aéreo pobremente reversible (1). El valor del volumen espirado en el primer segundo (FEV₁) estratifica la gravedad de la enfermedad (estadios GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease)) y dirige su tratamiento¹. Sin

embargo la EPOC es una enfermedad compleja, multi-componente y heterogénea (Figura 1) cuya presentación clínica, funcional y radiológica varía de manera importante entre pacientes con limitación al flujo aéreo similar. El análisis de los resultados del estudio ECLIPSE (Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints)² en el momento del reclutamiento de los pacientes ha mostrado claramente que la variabilidad de los síntomas,

tolerancia al ejercicio, exacerbaciones y prevalencia de comorbilidades en cada estadio GOLD es enorme, lo que indica que esta clasificación es un pobre descriptor de las características clínicas y funcionales de la EPOC. Por otra parte, diversos ensayos clínicos han mostrado que la respuesta terapéutica a los tratamientos actualmente disponibles también es heterogénea^{3,4}, por lo que se hace necesario identificar grupos de pacientes con características clínicas y biológicas comunes que puedan eventualmente compartir pronóstico y tratamiento (fenotipos)⁵.

Definición de Fenotipo

En sentido amplio, un fenotipo es cualquier característica o rasgo observable de un organismo, como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas, fisiología y comportamiento. Los fenotipos resultan de la expresión de los genes de un organismo, junto con de la influencia de los factores ambientales, y de las posibles interacciones entre ambos⁶. Por el contrario, el genotipo de un organismo es el conjunto de instrucciones heredadas que lleva en su código genético, se expresen o no. No todos los organismos que comparten el

mismo genotipo se parecen o actúan de la misma manera, porque la apariencia y el comportamiento se modifican por condiciones ambientales y del desarrollo. Por tanto, el fenotipo es el resultado final de la interacción entre el genotipo y el ambiente.

La identificación de fenotipos en la EPOC se ha abordado desde los años cincuenta del pasado siglo, cuando Dornhorst⁷ propuso la distinción entre soplador rosado ("pink puffer") y abotargado azul ("blue bloter"), basándose en una valoración exclusivamente clínica. Aunque este término se ha utilizado ampliamente en medicina y en particular en EPOC⁸, los fenotipos deberían permitir clasificar los pacientes en subgrupos diferentes que aporten información pronóstica y ayudar a determinar la terapia adecuada. Para ello, recientemente se ha propuesto la definición de "fenotipo clínico"⁹ como "Un único atributo o un conjunto de atributos de la enfermedad que describen las diferencias entre individuos con EPOC y que se relacionan con consecuencias clínicas relevantes (como síntomas, exacerbaciones, respuesta al tratamiento, progresión de la enfermedad o muerte)". De acuerdo a esta definición, cualquier fenotipo

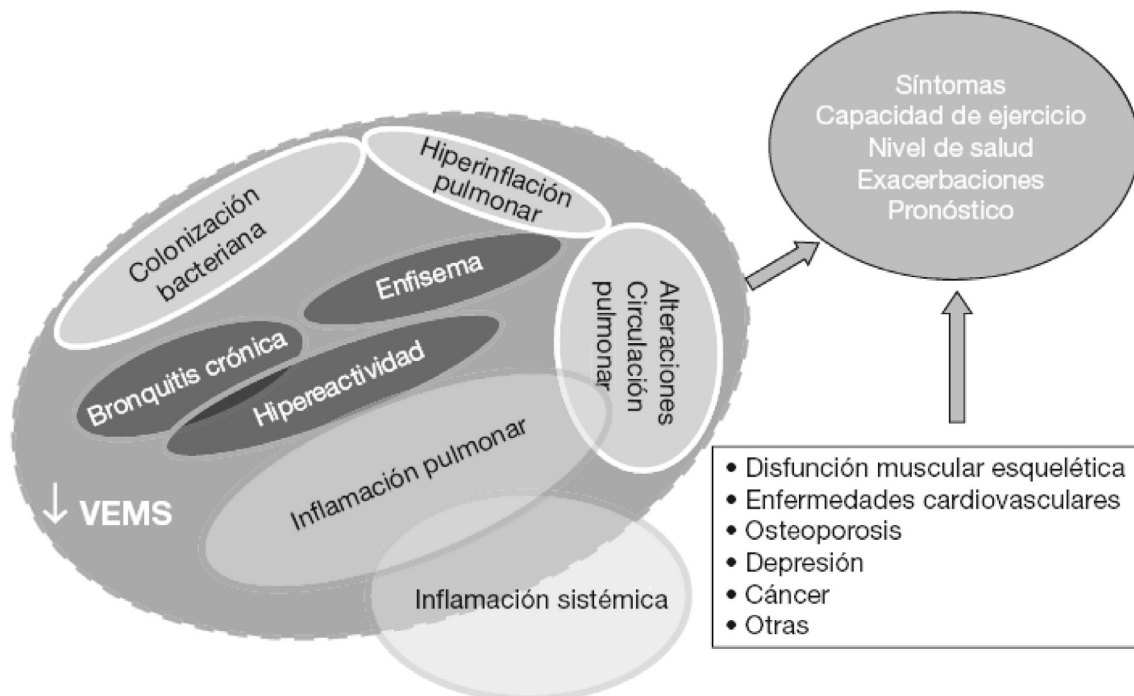


Figura 1. Diagrama de los diferentes componentes de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Los diferentes componentes intra y extrapulmonares acaban impactando de forma independiente o sinérgica sobre la calidad de vida y pronóstico del paciente, por lo que el adecuado manejo clínico de un paciente con EPOC debe, ineludiblemente, diagnosticar y tratar todos aquellos componentes presentes en un enfermo individual².

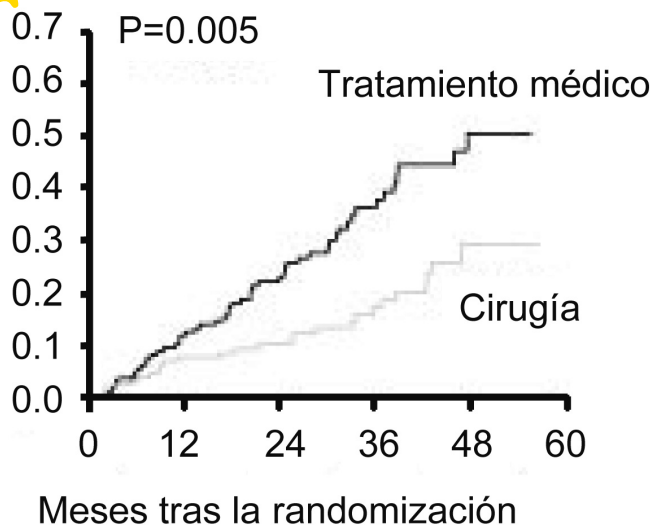


Figura 2. Pacientes con enfisema de predominio en lóbulos superiores y baja capacidad de ejercicio tras un programa de rehabilitación presentan menor mortalidad. Para más información ver texto. Modificado de Fishman et. Al.¹⁶

clínico que se proponga debe tener valor predictivo, debe ser validado prospectivamente para cada consecuencia (“outcome”) a la que se refiera y debe ser capaz de clasificar a los pacientes en diferentes grupos que proporcionen información pronóstica y permitan determinar la terapia más adecuada⁹.

Fenotipos validados

Muchos de los fenotipos propuestos en la EPOC ⁽¹⁰⁻¹⁰⁾ no satisfacen esta definición puesto que derivan de estudios transversales y sus consecuencias clínicas no se han validado prospectivamente. Sin embargo, algunos sí la satisfacen.

Insuficiencia Respiratoria Crónica

Uno de los primeros fenotipos en identificarse fue la presencia de insuficiencia respiratoria crónica. Los pacientes con EPOC avanzada presentan alteración del intercambio gaseoso principalmente por una mala relación ventilación-perfusión. Su presencia influye negativamente en la mortalidad de estos enfermos¹¹ así como en sus ingresos hospitalarios por agudización¹². En este grupo de pacientes se ha demostrado que un tratamiento específico, la oxige-

noterapia domiciliaria, mejora el pronóstico^{13,14}, mientras que ésta no mejora en pacientes con hipoxemia moderada¹⁵. Estas características permiten definir la presencia de insuficiencia respiratoria crónica como un fenotipo clínico en la EPOC.

Cirugía de reducción de volumen

Un fenotipo identificado más recientemente corresponde a los pacientes que se benefician de la cirugía de reducción de volumen. Pacientes con enfisema de predominio en lóbulos superiores y baja capacidad de ejercicio tras un programa de rehabilitación presentan menor mortalidad (Figura 2), mayor posibilidad de mejorar su capacidad de ejercicio y mayor probabilidad de mejorar los síntomas si son sometidos a cirugía de reducción de volumen, cuando se comparan con recibir solamente tratamiento médico¹⁶.

Déficit de alfa-1-Antitripsina

El déficit de alfa-1 antitripsina (AAT) fue una de las primeras enfermedades genéticas descritas y se asocia de manera importante con la presencia de enfisema¹⁷. Se caracteriza por niveles bajos de AAT en suero y alvéolos. Los pacientes con esta deficiencia sólo suponen el 3% de los pacientes con EPOC^{17,18}, pero disponen de un tratamiento específico sustitutivo de AAT. Un estudio reciente, multicéntrico, doble ciego, controlado con placebo con seguimiento de 2 a 2,5 años mostraba que la progresión del enfisema y la frecuencia de exacerbaciones es menor en el grupo tratado con terapia sustitutiva que en el grupo placebo¹⁹.

Inhibidor de la Fosfodiesterasa 4

Los fármacos inhibidores de la fosfodiesterasa 4 (FDE4) suponen un nuevo abordaje en el tratamiento de la EPOC y un ejemplo de tratamiento específico para una subpoblación de pacientes con EPOC. Los tratamientos que bloquean la FDE4 han mostrado amplios efectos antiinflamatorios tanto in-vitro como in-vivo²⁰. Roflumilast, un nuevo inhibidor de la FDE4 reduce la inflamación en la EPOC, reflejada por el conteo de neutrófilos y eosinófilos en esputo. Inicialmente Roflumilast fue estudiado en la población EPOC en general pero finalmente se determinó que es una subpoblación de pacientes con historia de bronquitis crónica y limitación intensa al flujo aéreo la que presenta mejoría en la función pulmonar (Figura 3) así como reducción en la frecuencia de exacerbaciones²¹.

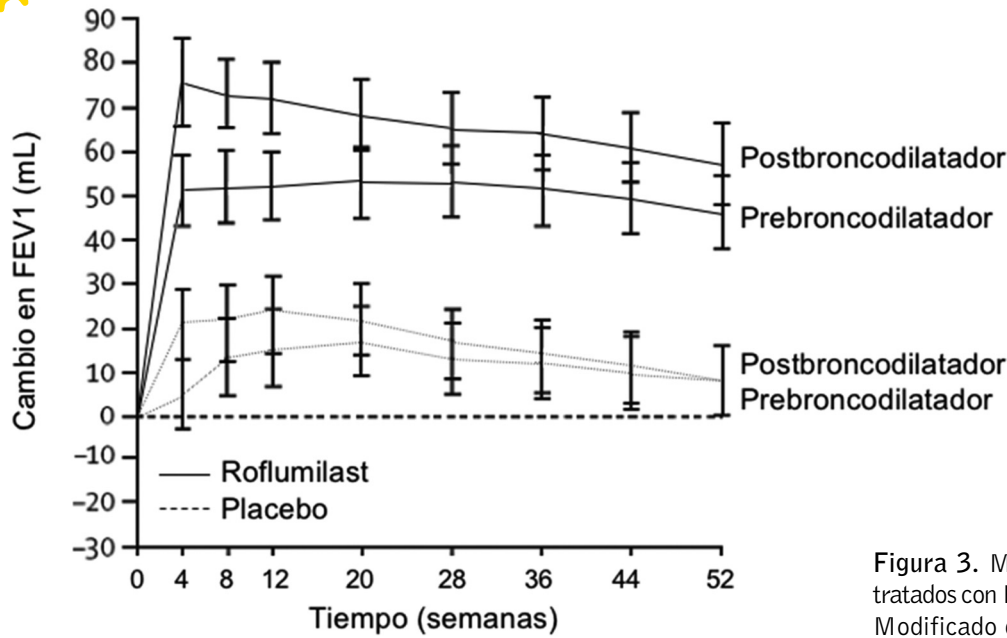
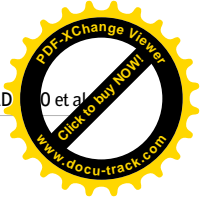
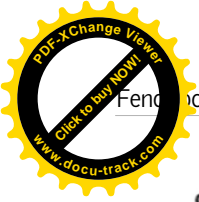


Figura 3. Mejoría en el FEV1 en pacientes tratados con Roflumilast comparado con placebo. Modificado de Calverley et al.²¹

Exacerbador Frecuente

Recientemente se ha identificado un grupo de pacientes que parecen ser más susceptibles a presentar agudizaciones, independientemente de la gravedad de la enfermedad²². Las exacerbaciones de la enfermedad conllevan efectos negativos en la calidad de vida, tanto a corto como a largo plazo. Además las exacerbaciones repetidas implican efectos negativos a largo plazo en la función pulmonar²³. El factor más determinante para presentar exacerbaciones es una historia previa de exacerbaciones. Este grupo de pacientes genera un consumo de recursos considerable así como una mayor morbilidad y mortalidad. De forma añadida, este grupo puede ser particularmente relevante porque parece responder mejor al tratamiento con broncodilatadores inhalados, tanto solos como en combinación con corticoides inhalados²⁴. Del mismo modo, se podría evitar tomar medidas agresivas en la prevención de las exacerbaciones en pacientes con enfermedad muy grave si estos no presentan una historia de frecuencia de dichos eventos²².

Fenotipos potenciales

Existen algunos fenotipos que parecen definir subgrupos de pacientes pero cuyo valor pronóstico debería ser validado en estudios prospectivos.

Pérdida acelerada de función

El FEV1 generalmente declina con la edad a un ritmo aproximado de 30 mL/año. La pérdida acelerada de función pulmonar no solamente es un predictor de morbilidad, mortalidad y tasas de hospitalización²⁵, si no que también se ha relacionado con patrones de biomarcadores en plasma²⁶. Una progresión de pérdida acelerada representada por estos cambios en el FEV1 podría indicar un fenotipo distinto.

Enfisema

El enfisema pulmonar se caracteriza por la presencia de aumento del espacio aéreo mas allá del bronquiolo terminal (espacio alveolar); se trata, pues, de un diagnóstico anatómo-patológico. El enfisema pulmonar disminuye la retracción elástica pulmonar encargada de generar dicho flujo y contribuye a la colapsabilidad de las vías aéreas periféricas con el consecuente incremento del volumen pulmonar al final de la espiración y el descenso de la capacidad inspiratoria. En una cohorte de 629 pacientes se observó que la relación IC/TLC (Capacidad Inspiratoria/ Capacidad Pulmonar Total) predice mortalidad, tanto por causas respiratorias como por cualquier causa, mejor que el FEV1 solo²⁷. El desarrollo y mejora de las técnicas de imagen (Tomografía Axial Computerizada, TAC) junto con nuevos algoritmos analíticos ha aumentado las posibilidades de estudiar la in-

tensidad, extensión y distribución de esta destrucción en el pulmón²⁸. La cuantificación del enfisema por medio del TAC ofrece una medida objetiva de la enfermedad parenquimatosas que se correlaciona con los hallazgos histopatológicos y predice el grado de obstrucción al flujo espiratorio. La intensidad del enfisema medida por TAC se ha asociado con peor estado de salud y mayor mortalidad²⁹. La pérdida de elasticidad y el desarrollo de limitación al flujo espiratorio promueven el atrapamiento aéreo progresivo. Sin embargo, todavía se desconoce si la existencia de anomalías como la presencia de enfisema, el engrosamiento de la pared y/o las bronquiectasias, predicen consecuencias clínicas relevantes.

Colonización Bacteriana

En contraste con las vías aéreas asépticas de controles sanos, se han aislado bacterias en una proporción relativamente alta de pacientes con EPOC en fase estable. Aquellos pacientes fumadores activos y con obstrucción progresiva presentan colonización bacteriana con más frecuencia, mostrando una alteración del sistema inmune pulmonar. Di-

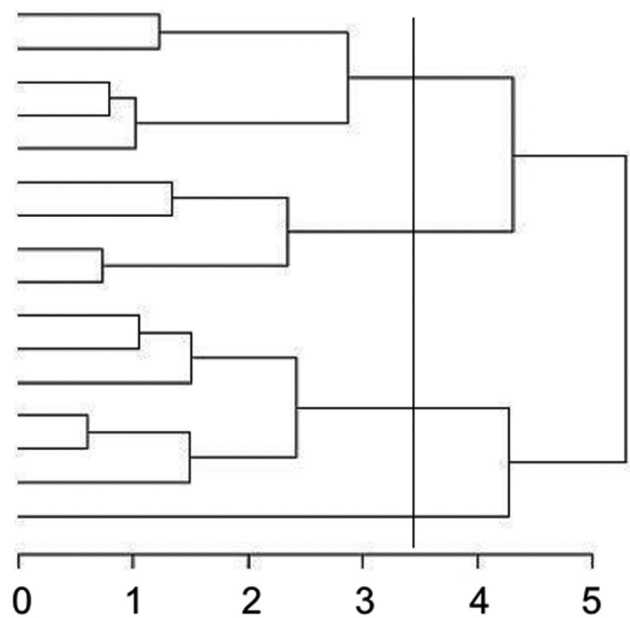


Figura 4. Dendrograma que ilustra los resultados de un análisis de «clusters». Cada línea horizontal representa un individuo y la longitud de la línea horizontal representa el grado de similitud entre sujetos. La línea vertical identifica el número óptimo de «clusters».

cha colonización se ha relacionado con una mayor respuesta inflamatoria representada por cifras elevadas de marcadores inflamatorios como la mieloperoxidasa, la neutrófilo elastasa, la IL-8 y la IL-6, que se relacionan con la carga de microorganismos potencialmente patógenos en la colonización. Asimismo está asociada con un incremento en la frecuencia de las agudizaciones y un deterioro en el valor del FEV1. Todavía no está claro si el tratamiento antibiótico crónico dedicado a erradicar esta colonización tiene un efecto clínico significativo³¹.

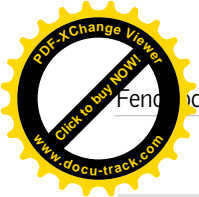
Inflamación sistémica

Los pacientes con EPOC presentan concentraciones séricas elevadas de leucocitos y distintos biomarcadores (IL-1beta, IL-6, IL-8, TNF-alfa), fibrinógeno y proteína C reactiva (PCR), si bien esta inflamación sistémica no aparece de forma constante en todos los pacientes con EPOC (32). De hecho, la prevalencia de inflamación sistémica en la EPOC parece depender del marcador escogido. Esta inflamación puede aparecer en pacientes clínicamente estables, aumentando aún más durante las exacerbaciones²². Sin embargo, todavía no se ha esclarecido una asociación entre la presencia de esta inflamación y aspectos particulares de la EPOC como la intensidad de la limitación al flujo aéreo, la presencia de enfisema, la colonización bacteriana, la hipoxemia arterial, las comorbilidades o los síntomas. Del mismo modo todavía se desconoce si el tratamiento dirigido a optimizar la función pulmonar en la EPOC conlleva una reducción en la inflamación sistémica en estos pacientes^{33,34}.

Perspectivas futuras

La identificación de nuevos fenotipos en la EPOC requiere de un proceso de validación en el que se determinen las consecuencias clínicas de los fenotipos potenciales. Desde un punto de vista práctico dicha validación requiere de estudios longitudinales que recojan datos de poblaciones bien definidas. En el momento actual existen distintos estudios en marcha con dichas características.

A nivel nacional el estudio de Caracterización Fenotípica y Evolución de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (PAC-COPD)³⁵ pretende mejorar la comprensión de la heterogeneidad fenotípica de esta enfermedad y el grado en que



| | Fenotipo 1: joven/intensa | Fenotipo 2: mayor/leve | Fenotipo 3: joven/moderada | Fenotipo 4: mayor/intensa |
|---------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Edad | Joven | Mayor | Joven | Mayor |
| Enfermedad Respiratoria * | Muy intensa | Leve | Moderada | Moderada |
| Estado Nutricional | Bajo peso | Sobrepeso | Normal | Sobrepeso |
| Fracaso Cardíaco Crónico | Ausente | Ausente | Ausente | Frecuente |
| Depresión | Muy frecuente | Ausente | Ausente | Frecuente |
| Deterioro Calidad de vida | Muy Intenso | Leve | Moderado | Intenso |

Tabla I. Resumen de los fenotipos identificados mediante el uso de análisis de «clusters» basado en el análisis de componentes principales, considerando obstrucción al flujo aéreo, disnea y tasa de exacerbaciones. Modificado de Burgel et al.⁴⁵

dicha heterogeneidad se relaciona con su evolución. Su diseño incluye un estudio transversal y un estudio de seguimiento de 4 años en pacientes que ingresan por primera vez por agudización de EPOC³⁶. A través del análisis de agrupaciones (clusters) y su validación prospectiva se han identificado tres subgrupos de pacientes con EPOC: Grupo 1 (“EPOC Grave Respiratoria”) caracterizado por limitación intensa al flujo aéreo (FEV1 38% del teórico) y peor “performance” en la mayoría de los dominios de la enfermedad; el Grupo 2 (EPOC Moderada Respiratoria”) con limitación más leve (FEV1 63% del teórico) y el Grupo 3 (“EPOC Sistémica”) que combina una limitación al flujo aéreo similar (FEV1 58% del teórico) con mayor proporción de obe-

sidad, enfermedades cardiovasculares, diabetes e inflamación sistémica. Durante el seguimiento el Grupo 1 presentó más hospitalizaciones debidas a EPOC y mayor mortalidad por cualquier causa que los otros grupos, mientras que el Grupo 3 presentó más ingresos por causa cardiovascular.

En el ámbito internacional, como se mencionaba al comienzo del texto, el estudio ECLIPSE es un estudio observacional de pacientes con EPOC y controles llevado a cabo en 46 centros de 12 países cuyo objetivo es definir distintos fenotipos e identificar biomarcadores y/o variables genéticas que ayuden a predecir la progresión de la enfermedad³⁷. Otras estrategias incluyen estudios como SPIROMICS (Subpopulations and intermediate outcome measures in



COPD study) que igualmente recoge de forma prospectiva y analiza los datos fenotípicos, genéticos, genómicos, clínicos y de biomarcadores de sujetos con EPOC con el propósito de identificar subpoblaciones y consecuencias clínicas relevantes³⁸, o el COPDGene® Study cuyo objetivo es estudiar los factores genéticos que subyacen en la EPOC³⁹. A través del reclutamiento de 10,000 individuos, fumadores y no fumadores entre 45 y 80 años, pretende encontrar factores genéticos subyacentes a la predisposición de algunos fumadores para desarrollar EPOC. Asimismo a través del uso de la TAC busca clasificar mejor a los pacientes para tratar de entender cómo la enfermedad puede diferir entre pacientes.

Para la identificación de estos fenotipos se utilizan técnicas estadísticas avanzadas como son el análisis de "clusters" y el análisis de factores. El análisis de "clusters" es un conjunto de técnicas utilizadas para clasificar los objetos o casos en grupos homogéneos llamados conglomerados o agrupaciones (clusters) con respecto a algún criterio de selección predeterminado⁴⁰. Los objetos dentro de cada grupo (conglomerado), son similares entre sí (alta homogeneidad interna) y diferentes a los objetos de los otros conglomerados (alta heterogeneidad externa)⁴¹. El dendrograma (Figura 4) es una representación gráfica en forma de árbol de los resultados del análisis de "cluster" jerárquico. Cada paso del análisis se representa como una fusión entre dos ramas. Una técnica estadística asociada es el análisis factorial que consiste en una reducción de datos usada para explicar la variabilidad entre las variables observadas, en términos de un número menor de variables no observadas llamadas factores⁴².

Estas técnicas estadísticas han sido aplicadas recientemente en la EPOC para caracterizar distintos fenotipos⁴³⁻⁴⁵. En el más reciente de ellos, Burgel et al. a partir de una cohorte de 322 pacientes con diagnóstico de EPOC realizaron un análisis de "clusters" basado en un análisis factorial previo y dividieron a dichos pacientes en cuatro fenotipos (Tabla 1). El fenotipo 1 (pacientes con enfermedad grave y desnutrición) y el fenotipo 4 (sobrepeso moderado con obstrucción moderada-intensa) podría corresponderse con la clásica descripción entre soplador rosado y abotargado azul que se comentaba al comienzo del texto. Un método similar se ha empleado para estudiar fenotipos en una población más concreta de pacientes con enfisema⁴⁶. En esta ocasión se incluyeron tanto variables fenotípicas como ge-

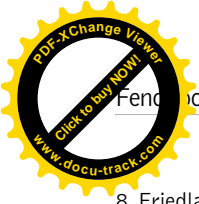
notípicas de 308 sujetos y se identificaron cuatro fenotipos: 1) predominio de enfisema, 2) grado moderado con respuesta broncodilatadora, 3) discordancia entre función pulmonar/TAC e intensidad de la obstrucción, 4) predominio de alteración de la vía aérea. De los genotipos examinados los miembros del primer grupo se asociaban con polimorfismos en el TGFB1. Análisis estadísticos como los arriba mencionados, son capaces de identificar variables clave con las que agrupar a los pacientes. Sin embargo, estos análisis requieren estudios longitudinales para determinar su valor pronóstico.

Conclusiones

La heterogeneidad de la EPOC conlleva la necesidad de identificar subgrupos de pacientes con consecuencias clínicas similares. Algunos de estos fenotipos ya han sido validados y bien caracterizados. Actualmente se dispone de las técnicas diagnósticas y estadísticas necesarias para identificar estos fenotipos y así poder desarrollar guías clínicas orientadas específicamente a cada tipo de paciente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007 September 15;176(6):532-55.
2. Agustí A, Calverley PM, Celli B, Coxson HO, Edwards LD, Lomas DA et al. Characterisation of COPD heterogeneity in the ECLIPSE cohort. *Respir Res* 2010;11:122.
3. Calverley PM, Anderson JA, Celli B, Ferguson GT, Jenkins C, Jones PW et al. Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2007 February 22;356(8):775-89.
4. Tashkin DP, Celli B, Senn S, Burkhart D, Kesten S, Menjoge S et al. A 4-year trial of tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2008 October 9;359(15):1543-54.
5. Alvar Agustí, Patricia Sobradillo, Bartolomé Celli. Addressing the complexity of COPD. *Am J Respir Crit Care Med*. In press 2010.
6. Rice JP SNRE. Definition of the Phenotype. *Adv Genet* 2001;42:69-76.
7. DORNHORST AC. Respiratory insufficiency. *Lancet* 1955 June 11;268(6876):1185-7.



8. Friedlander AL, Lynch D, Dyar LA, Bowler RP. Phenotypes of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 2007 January 1;4(4):355-84.
9. Han MK, Agusti A, Calverley PM, Celli BR, Criner G, Curtis JL et al. COPD Phenotypes: The Future of COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 2010 June 3.
10. Marsh SE, Travers J, Weatherall M, Williams MV, Aldington S, Shirtcliffe PM et al. Proportional classifications of COPD phenotypes. *Thorax* 2008 September;63(9):761-7.
11. Burrows B, Earle RH. Course and prognosis of chronic obstructive lung disease. A prospective study of 200 patients. *N Engl J Med* 1969 February 20;280(8):397-404.
12. Kessler R, Faller M, Fourgaut G, Menecier B, Weitzenblum E. Predictive factors of hospitalization for acute exacerbation in a series of 64 patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999 January;159(1):158-64.
13. Long term domiciliary oxygen therapy in chronic hypoxic cor pulmonale complicating chronic bronchitis and emphysema. Report of the Medical Research Council Working Party. *Lancet* 1981 March 28;1(8222):681-6.
14. Continuous or nocturnal oxygen therapy in hypoxemic chronic obstructive lung disease: a clinical trial. Nocturnal Oxygen Therapy Trial Group. *Ann Intern Med* 1980 September;93(3):391-8.
15. Gorecka D, Gorzelak K, Sliwinski P, Tobiasz M, Zielinski J. Effect of long-term oxygen therapy on survival in patients with chronic obstructive pulmonary disease with moderate hypoxaemia. *Thorax* 1997 August;52(8):674-9.
16. Fishman A, Martinez F, Naunheim K, Piantadosi S, Wise R, Ries A et al. A randomized trial comparing lung-volume-reduction surgery with medical therapy for severe emphysema. *N Engl J Med* 2003 May 22;348(21):2059-73.
17. Eriksson S. Studies in alpha 1-antitrypsin deficiency. *Acta Med Scand Suppl* 1965;432:1-85.
18. Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Lange P, Vestbo J, Nordestgaard BG. Change in lung function and morbidity from chronic obstructive pulmonary disease in alpha1-antitrypsin MZ heterozygotes: A longitudinal study of the general population. *Ann Intern Med* 2002 February 19;136(4):270-9.
19. Dirksen A, Piitulainen E, Parr DG, Deng C, Wencker M, Shaker SB et al. Exploring the role of CT densitometry: a randomised study of augmentation therapy in alpha1-antitrypsin deficiency. *Eur Respir J* 2009 June;33(6):1345-53.
20. Bundschuh DS, Eltze M, Barsig J, Wollin L, Hatzelmann A, Beume R. In vivo efficacy in airway disease models of roflumilast, a novel orally active PDE4 inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 2001 April;297(1):280-90.
21. Calverley PM, Rabe KF, Goehring UM, Kristiansen S, Fabbri LM, Martinez FJ. Roflumilast in symptomatic chronic obstructive pulmonary disease: two randomised clinical trials. *Lancet* 2009 August 29;374(9691):685-94.
22. Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, Locantore N, Mullerova H, Tal-Singer R et al. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2010 September 16;363(12):1128-38.
23. Silverman EK. Exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease: do they contribute to disease progression? *Proc Am Thorac Soc* 2007 December;4(8):586-90.
24. Ferguson GT, Anzueto A, Fei R, Emmett A, Knobil K, Kalberg C. Effect of fluticasone propionate/salmeterol (250/50 microg) or salmeterol (50 microg) on COPD exacerbations. *Respir Med* 2008 August;102(8):1099-108.
25. Wise RA. The value of forced expiratory volume in 1 second decline in the assessment of chronic obstructive pulmonary disease progression. *Am J Med* 2006 October;119(10 Suppl 1):4-11.
26. Devanarayan V, Scholand MB, Hoidal J, Leppert MF, Crackower MA, O'Neill GP et al. Identification of distinct plasma biomarker signatures in patients with rapid and slow declining forms of COPD. *COPD* 2010 February;7(1):51-8.
27. Casanova C, Cote C, de Torres JP, Aguirre-Jaime A, Marin JM, Pinto-Plata V et al. Inspiratory-to-Total Lung Capacity Ratio Predicts Mortality in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005 March 15;171(6):591-7.
28. Patel BD, Coxson HO, Pillai SG, Agusti AG, Calverley PM, Donner CF et al. Airway wall thickening and emphysema show independent familial aggregation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008 September 1;178(5):500-5.
29. Han MK, Bartholmai B, Liu LX, Murray S, Curtis JL, Sciurba FC et al. Clinical significance of radiologic characterizations in COPD. *COPD* 2009 December;6(6):459-67.
30. Zhang M, Li Q, Zhang XY, Ding X, Zhu D, Zhou X. Relevance of lower airway bacterial colonization, airway inflammation, and pulmonary function in the stable stage of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010. August 20;1-7
31. Sethi S, Jones PW, Theron MS, Miravittles M, Rubinstein E, Wedzicha JA et al. Pulsed moxifloxacin for the prevention of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: a randomized controlled trial. *Respir Res* 2010;11:10.
32. Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* 2004 July;59(7):574-80.



33. Sin DD, Man SF, Marciniuk DD, Ford G, FitzGerald M, Wong E et al. The effects of fluticasone with or without salmeterol on systemic biomarkers of inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008 June 1;177(11):1207-14.
34. Sin DD, Lacy P, York E, Man SF. Effects of fluticasone on systemic markers of inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004 October 1;170(7):760-5.
35. Garcia-Aymerich J, Gomez FP, Anto JM. [Phenotypic characterization and course of chronic obstructive pulmonary disease in the PAC-COPD Study: design and methods]. *Arch Bronconeumol* 2009 January;45(1):4-11.
36. Garcia-Aymerich J., F. Gómez, M. Benet, E, Farrero, X. Basagana, A. Gayete, C. Paré, X. Freixa, J. Ferrer, J. Roca, et al. Identification and prospective validation of clinically relevant chronic obstructive pulmonary disease (COPD) subtypes. *Thorax*. In press 2010.
37. Vestbo J, Anderson W, Coxson HO, Crim C, Dawber F, Edwards L et al. Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate End-points (ECLIPSE). *Eur Respir J* 2008 April;31(4):869-73.
38. Subpopulations and intermediate outcome measures in COPD study (SPIROMICS). 2010. Ref Type: Online Source
39. Regan EA, Hokanson JE, Murphy JR, Make B, Lynch DA, Beaty TH et al. Genetic epidemiology of COPD (COPDGene) study design. *COPD* 2010 February;7(1):32-43.
40. McLachlan GJ. Cluster analysis and related techniques in medical research. *Stat Methods Med Res* 1992;1(1):27-48.
41. Beasley R, Weatherall M, Travers J, Shirtcliffe P. Time to define the disorders of the syndrome of COPD. *Lancet* 2009 August 29;374(9691):670-2.
42. Roy K, Smith J, Kolsum U, Borrill Z, Vestbo J, Singh D. COPD phenotype description using principal components analysis. *Respir Res* 2009;10:41.
43. Wardlaw AJ, Silverman M, Siva R, Pavord ID, Green R. Multi-dimensional phenotyping: towards a new taxonomy for airway disease. *Clin Exp Allergy* 2005 October;35(10):1254-62.
44. Weatherall M, Travers J, Shirtcliffe PM, Marsh SE, Williams MV, Nowitz MR et al. Distinct clinical phenotypes of airways disease defined by cluster analysis. *Eur Respir J* 2009 October;34(4):812-8.
45. Burgel PR, Paillasser JL, Caillaud D, Tillie-Leblond I, Chanez P, Escamilla R et al. Clinical COPD phenotypes: a novel approach using principal component and cluster analyses. *Eur Respir J* 2010 September;36(3):531-9.
46. Cho MH, Washko GR, Hoffmann TJ, Criner GJ, Hoffman EA, Martinez FJ et al. Cluster analysis in severe emphysema subjects using phenotype and genotype data: an exploratory investigation. *Respir Res* 2010;11:30.

